



Manejo en bancos de germoplasma: estrategias para la ruptura de dormición de semillas de leguminosas

Sara Mira Pérez¹, Félix Pérez García¹, Alessandra Selbach Schnadelbach³, Eva Cristina Correa Hernando² & M. Elena González Benito¹

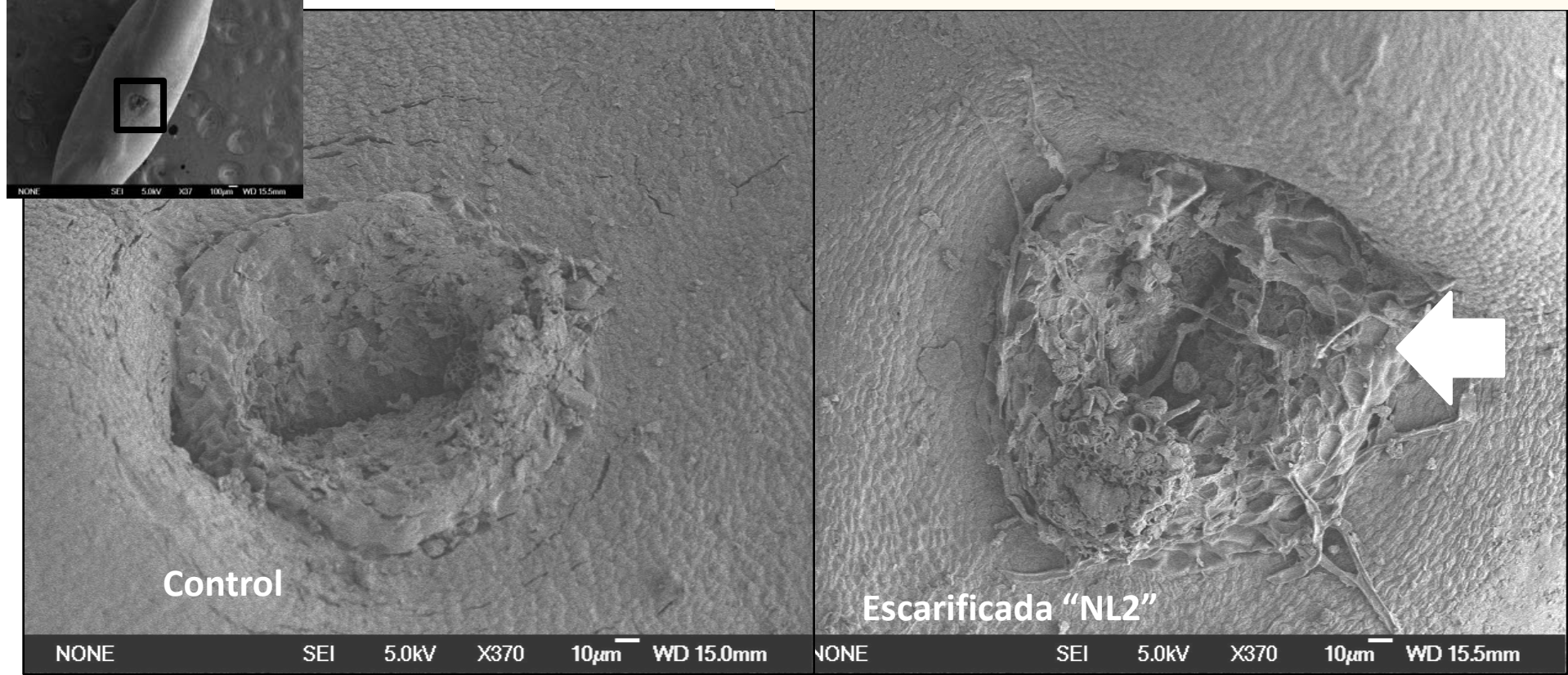
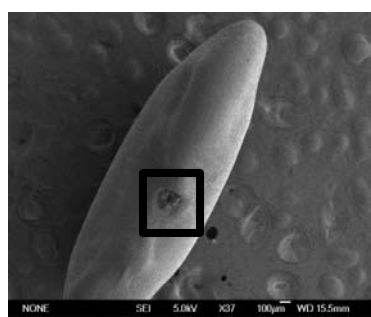
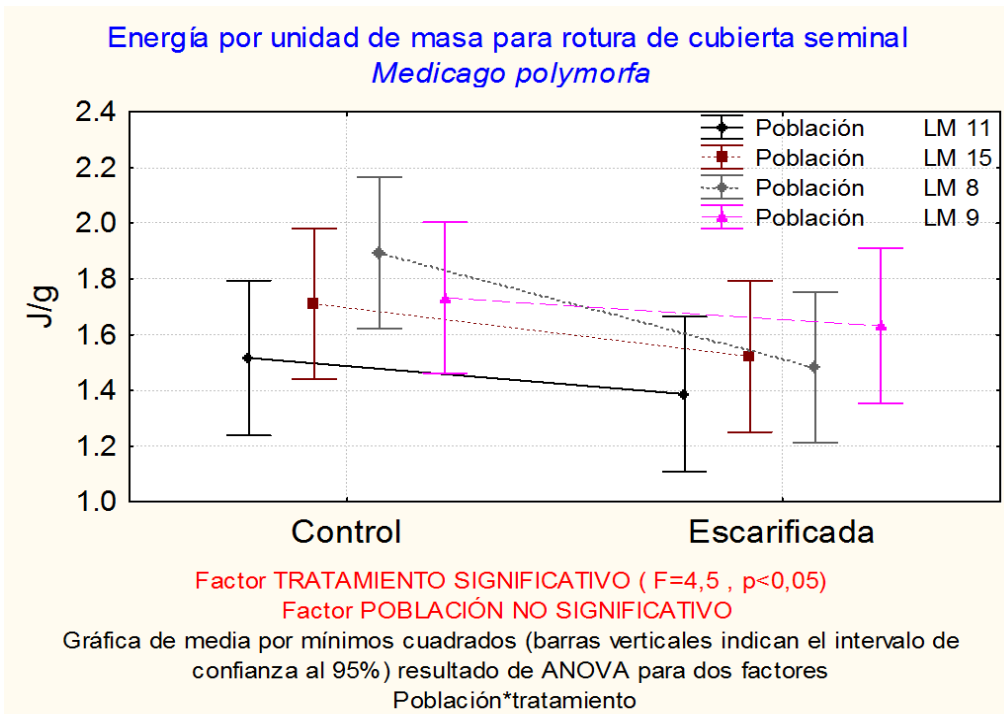
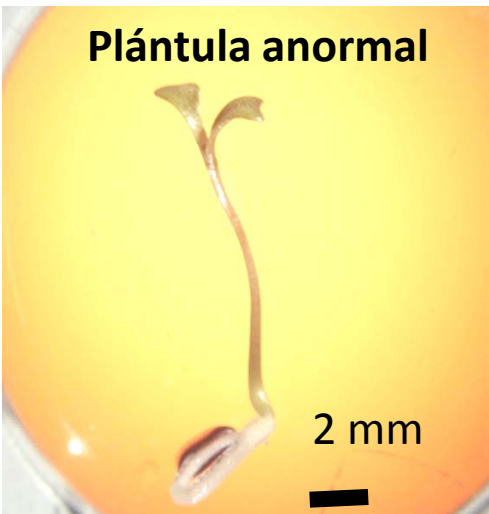
¹ Departamento de Biotecnología- Biología Vegetal, ²Departamento de Ingeniería Agroforestal; Universidad Politécnica de Madrid; Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, ³Departamento de Biologia Geral, Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil (sara.mira@upm.es)

Introducción

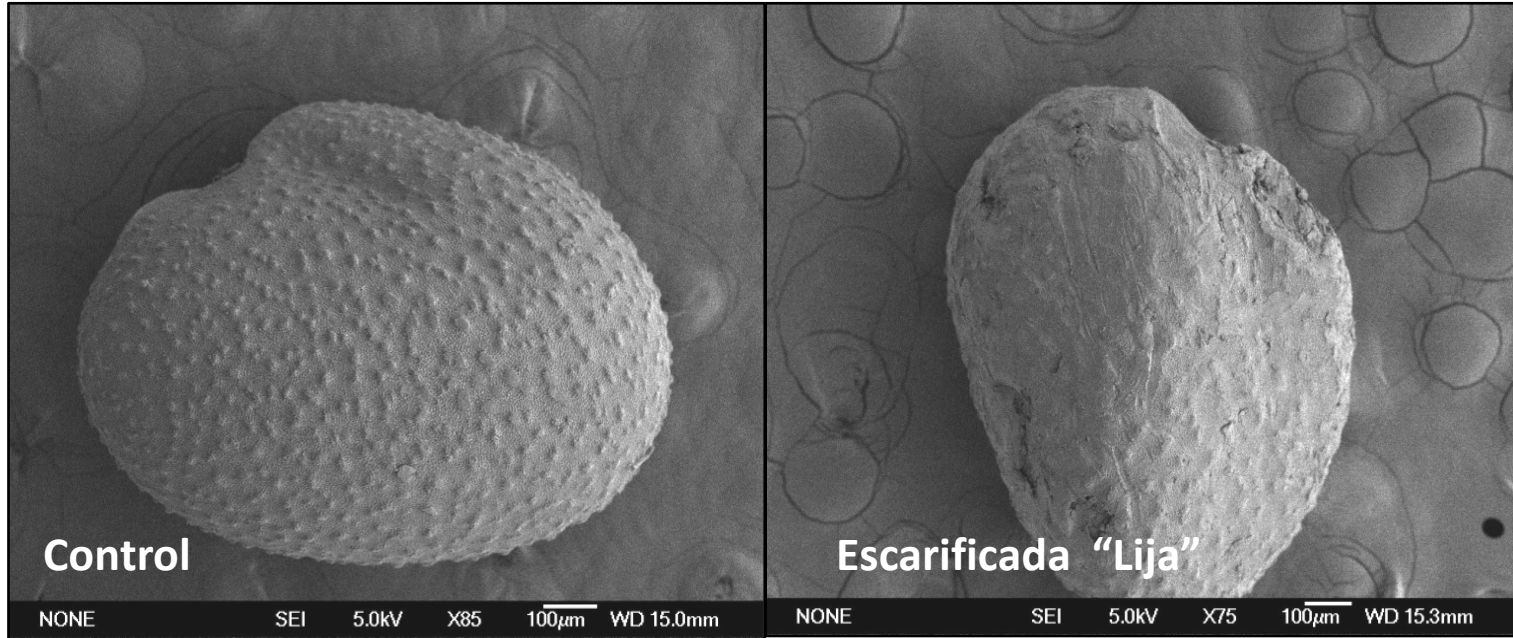
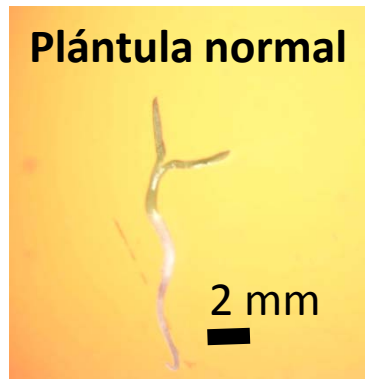
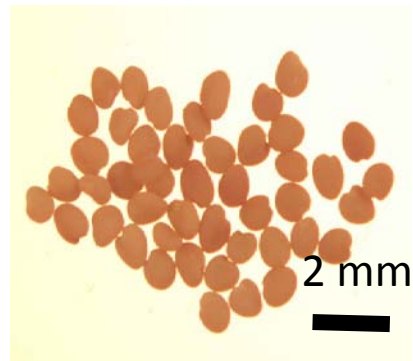
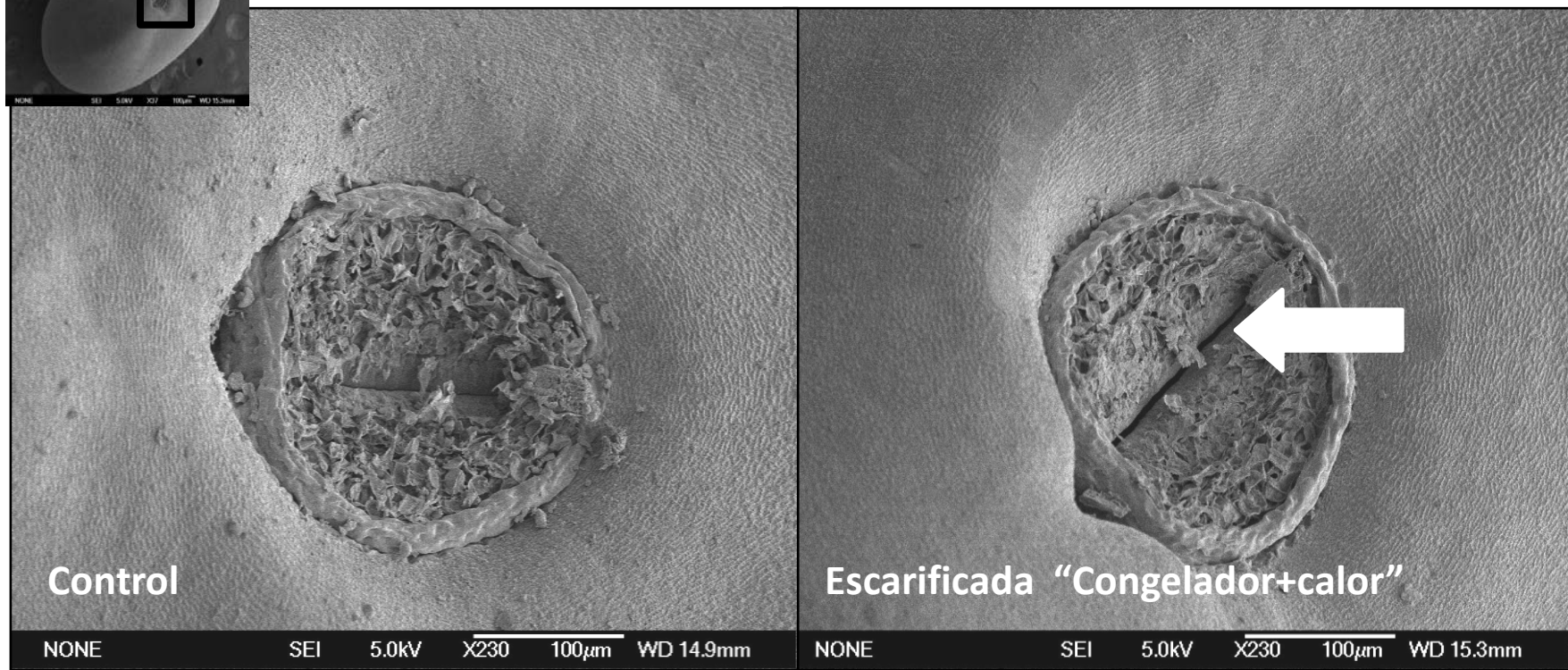
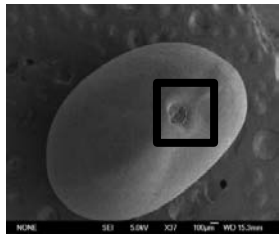
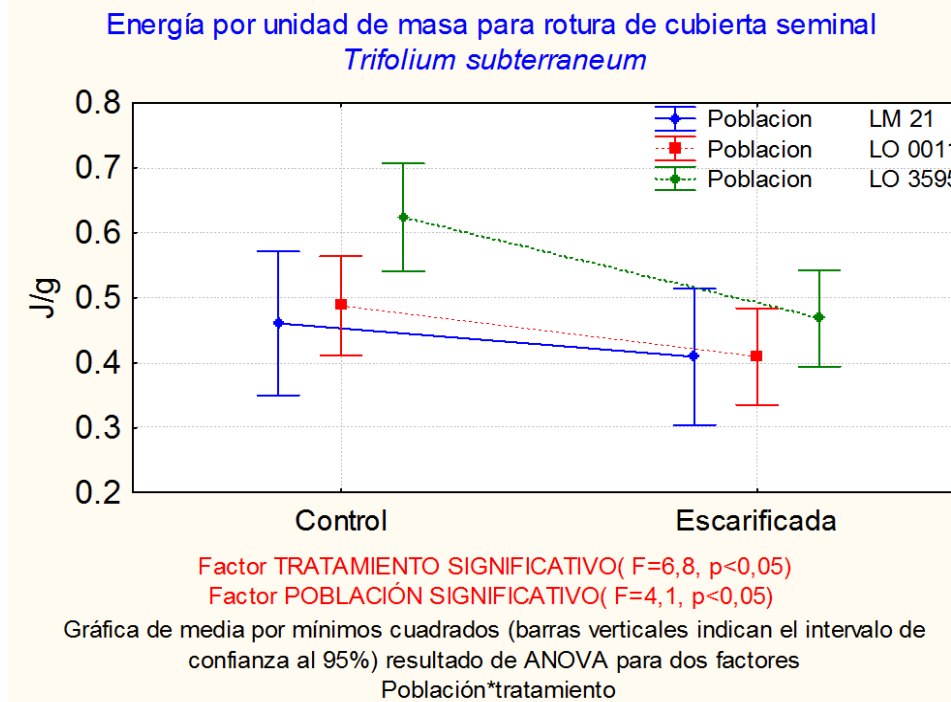
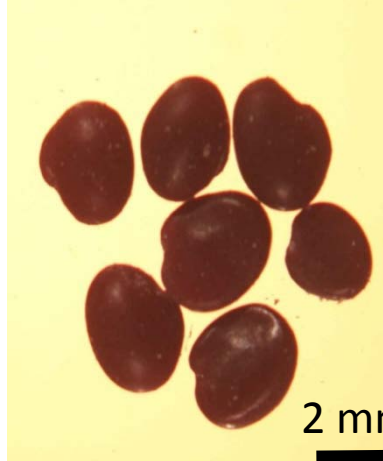
La gestión de los bancos de germoplasma mediante la conservación de semillas se encuentra, en ocasiones, con dificultades técnicas que pueden llegar a hacer su tarea poco eficiente. Una de esas dificultades puede ser el llevar a cabo los ensayos de viabilidad de las semillas de forma que los resultados se acerquen, lo más posible, a la verdadera situación de los lotes estudiados. Este aspecto tiene especial importancia en cuando las semillas presentan algún tipo de dormición. Una característica de las semillas de numerosas especies de la familia Fabaceae es presentar cubiertas duras e impermeables al agua. En estos casos la estrategia a aplicar se basa en utilizar tratamientos de escarificación de la cubierta seminal. Sin embargo, en ocasiones, la variabilidad dentro de un lote de semillas y entre lotes (por ejemplo distintas poblaciones de una misma especie) puede ser muy elevada. El objetivo de este trabajo fue estudiar la variabilidad de la dureza de la cubierta seminal entre cuatro poblaciones de cada una de las siguientes especies: *Medicago polymorpha*, *Trifolium glomeratum* y *T. subterraneum*. Estas especies presentan además semillas de muy pequeño tamaño que dificultan la efectividad de los tratamientos de escarificación.

Tablas.- Porcentaje de germinación final después de distintos tratamientos de escarificación en cuatro poblaciones de cada especie.

Tratamientos de escarificación ¹	G (% ± SE)			
	LM 8	LM 9	LM 11	LM 15
Control (*)	3 ± 1.66	2 ± 1.73	9 ± 3.57	2 ± 1.73
Lija (*)	36 ± 3.21	53 ± 8.08	65 ± 6.57	43 ± 5.46
Calor húmedo (*)	3 ± 0.87	3 ± 1.66	9 ± 2.18	4 ± 2.45
Calor seco 1				
Plántulas normales	8 ± 2.45	22 ± 3.00	10 ± 3.00	5 ± 1.66
Plántulas anormales	2 ± 1.00	6 ± 2.24	1 ± 0.87	0
Germinación final	10 ± 2.24	28 ± 5.10	11 ± 3.84	5 ± 1.66
Calor seco 2				
Plántulas normales	3 ± 1.47	2 ± 1.14	6 ± 2.24	1 ± 1.08
Plántulas anormales	0	0	2 ± 1.00	0
Germinación final	3 ± 1.47	2 ± 1.14	8 ± 2.45	1 ± 1.08
NL1				
Plántulas normales	52 ± 7.43	54 ± 3.32	51 ± 4.52	50 ± 2.24
Plántulas anormales	45 ± 6.19	38 ± 3.32	43 ± 6.14	45 ± 1.66
Germinación final	97 ± 2.16	92 ± 3.46	94 ± 4.10	95 ± 1.66
NL2				
Plántulas normales	96 ± 2.45	93 ± 2.96	95 ± 3.28	97 ± 0.87
Plántulas anormales	2 ± 1.73	5 ± 3.28	4 ± 2.45	2 ± 1.00
Germinación final	98 ± 1.00	98 ± 1.73	99 ± 0.87	99 ± 0.87
Congelador				
Plántulas normales	13 ± 2.96	14 ± 1.00	25 ± 2.60	9 ± 1.66
Plántulas anormales	59 ± 3.84	39 ± 4.55	55 ± 5.17	40 ± 1.41
Germinación final	72 ± 4.47	53 ± 5.36	80 ± 2.83	49 ± 2.60
Congelador + calor				
Plántulas normales	17 ± 3.57	25 ± 4.09	34 ± 3.32	15 ± 1.66
Plántulas anormales	54 ± 2.24	47 ± 2.60	57 ± 4.55	56 ± 4.24
Germinación final	71 ± 4.55	72 ± 4.26	91 ± 2.96	71 ± 4.55



Tratamiento de escarificación	Germinación (% ± SE)			
	LO 0011	LO 3570	LO 3595	LM 21
Control (*)	2 ± 1.73	13 ± 2.18	8 ± 2.45	7 ± 2.60
Lija (*)#	84 ± 2.45	79 ± 4.80	61 ± 5.89	98 ± 1.00
Calor húmedo (*)	91 ± 0.87	95 ± 1.77	89 ± 3.28	100
Calor seco 1 (*)	32 ± 5.48	75 ± 2.18	10 ± 1.00	74 ± 3.11
Calor seco 2				
Plántulas normales	47 ± 10.23	84 ± 3.16	38 ± 4.12	87 ± 2.48
Plántulas anormales	0	0	8 ± 2.45	0
Germinación final	47 ± 10.23	84 ± 3.16	46 ± 4.36	87 ± 2.48
NL1				
Plántulas normales	44 ± 1.41	72 ± 4.90	14 ± 6.08	52 ± 7.87
Plántulas anormales	10 ± 4.12	17 ± 4.97	22 ± 3.60	45 ± 6.22
Germinación final	54 ± 4.58	89 ± 0.87	36 ± 9.27	97 ± 2.60
NL2				
Plántulas normales	43 ± 5.89	77 ± 2.96	18 ± 3.21	47 ± 3.57
Plántulas anormales	10 ± 5.38	20 ± 2.45	28 ± 5.10	50 ± 3.32
Germinación final	53 ± 9.53	97 ± 1.66	46 ± 2.77	97 ± 1.66
Congelador (*)	86 ± 3.00	81 ± 4.73	81 ± 2.18	95 ± 1.66
Congelador + calor (*)	96 ± 2.00	94 ± 2.14	87 ± 3.84	96 ± 2.45



Tratamiento de Escarificación ¹	G (% ± SE)			
	LO 6669	LO 8150	LM 21	LM 23
Control	0	0	0	0
Lija				
Plántulas normales	96 ± 3.03	84 ± 5.51	100	91 ± 1.02
Plántulas anormales	2 ± 1.30	1 ± 0.43	0	1 ± 0.65
Germinación final	98 ± 1.73	85 ± 5.31	100	92 ± 0.50
Calor húmedo (*)	1 ± 0.87	1 ± 0.87	0	0
Calor seco 1 (*)	1 ± 0.87	40 ± 2.33	7 ± 2.32	16 ± 2.05
Calor seco 2				
Plántulas normales	8 ± 2.00	45 ± 1.95	48 ± 2.62	9 ± 2.56
Plántulas anormales	0	4 ± 1.68	6 ± 1.52	8 ± 5.66
Germinación final	8 ± 2.00	49 ± 2.49	54 ± 3.83	17 ± 4.22
NL 1				
Plántulas normales	1 ± 0.50	11 ± 1.08	16 ± 4.13	9 ± 3.48
Plántulas anormales	0	0	2 ± 0.75	1 ± 0.65
Germinación final	1 ± 0.50	11 ± 1.08	18 ± 4.74	10 ± 3.21
NL 2 (*)	1.5 ± 1.30	6 ± 1.88	14 ± 1.25	12 ± 2.91
Congelador (*)	1 ± 0.87	20 ± 2.83	11 ± 1.66	8 ± 2.45
Congelador + calor (*)	0	24 ± 5.48	11 ± 3.57	1 ± 0.87

#Sólo una repetición de 25 semillas

##(*) Todas las plántulas fueron normales (% germinación final = % plántulas normales)

Material y métodos

Para los ensayos de germinación de las tres especies se utilizaron cuatro replicas con un número variable de semillas (25-50) por repetición, dependiendo de la disponibilidad de semillas. La semillas se sembraron sobre dos discos de papel de filtro, colocados en una caja Petri de 7 cm de diámetro, humedecidos con 3,5 mL de agua destilada. Las semillas se incubaron a 25 °C, 16 h luz/15 °C, 8 h oscuridad. El porcentaje final de germinación se midió a las 30 días para *T. subterraneum* y a los 21 días para *T. glomeratum* y *M. polymorpha*. Los tratamientos aplicados previamente a la siembra fueron:

- **Control:** semillas no escarificadas (semillas intactas) antes de la siembra.
- **Lija:** abrasión de la cubierta seminal entre dos papeles de lija de grano fino.
- **Calor húmedo:** las semillas se sumergieron en agua hirviendo y se dejaron en el agua durante 24 h a temperatura ambiente.
- **Calor seco 1:** las semillas se calentaron en una estufa a 100 °C durante 30 min.
- **Calor seco 2:** las semillas se calentaron en una estufa a 100 °C durante 60 min.
- **NL1:** las semillas se sumergieron directamente en nitrógeno líquido (-196 °C) durante 30 minutos.
- **NL2:** las semillas se conservaron a -20 °C (en el congelador de una nevera, dentro de un criovial) por 24 h y luego se sumergieron directamente en nitrógeno líquido (-196 °C) durante 30 minutos.
- **Congelador:** las semillas se conservaron a -80 °C durante 24 h (dentro de un criovial).
- **Congelador + calor:** las semillas se conservaron a -80 °C durante 24 h (dentro de un criovial) y luego se sumergieron en agua caliente a 90 °C (dentro de un colador para infusiones) durante 5 segundos.

Mediante el equipo Texture Analyzer TAXTPLUS se midió la dureza de las semillas, en relación a su resistencia a la rotura, comparando semillas sin tratar (control) y semillas a las que se aplicó el tratamiento de escarificación que dio lugar a altos porcentajes de germinación en las accesiones estudiadas (marcados en **amarillo en las tablas**); este estudio no se pudo llevar a cabo en *T. glomeratum* debido al pequeño tamaño de sus semillas. Las cubiertas se observaron en un microscopio electrónico de barrido para detectar las posibles roturas causadas por el tratamiento de escarificación.

Resultados

M. polymorpha

El tratamiento con el que se consiguieron porcentajes de germinación cercanos al 100% fue “NL2”. En diversos tratamientos basados en choques térmicos con temperaturas inferiores a 0 °C (“NL1”, “Congelador” y “Congelador + calor”) el porcentaje de plántulas anormales fue relativamente elevado (38-59%). Sin embargo, en el tratamiento “NL2” (que además dio lugar al mayor porcentaje de germinación) el porcentaje de plántulas anormales fue bastante inferior (2-5%). Aunque para cada población no hubo diferencias significativas entre la energía aplicada hasta alcanzar la rotura de las semillas control o tratadas, sí que se observaron diferencias en el conjunto de las poblaciones. Las imágenes del MEB mostraron una importante disrupción de las células de la zona del hilo (flecha blanca).

T. subterraneum

Todos los tratamientos aumentaron significativamente la germinación respecto al control. Algunos tratamientos dieron lugar a porcentajes de germinación cercanos al 100% en todas las accesiones ensayadas (p.e. “Calor húmedo” y “Congelador+ calor”). Además estos tratamientos daban lugar siempre a plántulas normales, sin roturas ni deformaciones en los cotiledones o en la radícula. La aparición de plántulas anormales (con alguna rotura o deformación en los cotiledones o en la radícula) se pudo observar, en especial, en los dos tratamientos en los que las semillas fueron introducidas en nitrógeno líquido (tratamientos “NL1” y “NL2”). Se observaron diferencias significativas entre la energía aplicada hasta alcanzar la rotura de las semillas tanto en las control o tratadas, como entre las diferentes accesiones estudiadas. Las imágenes del MEB mostraron la zona del micropilo abierta en las semillas tratadas (flecha blanca).

T. glomeratum

Sólo la escarificación con lija dio lugar a porcentajes de germinación elevados. Aunque en algunas accesiones se observaron plantas anormales con el tratamiento de escarificación con lija, el porcentaje de las mismas era muy bajo (1-2 %). Las imágenes del MEB mostraron la disrupción general de la cubierta seminal.

Conclusiones

- La variabilidad interpoblacional, e incluso intrapoblacional, en la dureza de la cubierta de las semillas de leguminosas de especies silvestres puede dificultar enormemente la gestión de bancos de germoplasma en los que se conservan estas especies.
- Los tratamientos de escarificación mejoran los porcentajes de germinación de las muestras pero pueden, en algunas ocasiones, dañar los embriones de las semillas que presenten cubiertas menos duras. Este hecho es de especial relevancia en aquellas poblaciones de especies amenazadas en las que la disponibilidad de semillas es muy limitada.
- Los tratamientos de escarificación que dieron lugar a un mayor porcentaje de germinación en semillas de *M. polymorpha* y *T. subterraneum* no dieron lugar a disminuciones significativas de la dureza de la cubierta seminal dentro de cada población. Estos resultados están en consonancia con el hecho de que, en estas dos especies, sólo la zona del hilo de la semilla se viera afectada por el tratamiento.

